JNC CORPORATION

取扱説明書

セルファイン MAX シリーズ　強カチオンイオン交換体

Cellufine® MAX S-r, Cellufine® MAX S-h

製品の概要

セルファイン MAX は、セルファインの新しいクロマトグラフィー担体です。セルファイン MAX S 強カチオンイオン交換体は、高度に架橋し更に表面を修飾したベースを用いることで、高い動的吸着容量と高流速の安定した性能を保持します。最適化された高性能な MAX シリーズはダウンストリームの工程処理能力を高めます。
セルファイン MAX 強カチオン交換体には、MAX S-r（高回収、高分離、高耐性）MAX S-h（非常に高吸着）の２グレードがあります。

Characteristics of Cellufine MAX

Type	S-r	S-h
Ion exchange type	Strong cation / $-SO_3^-$	
Matrix	Highly cross-linked cellulose with dextran scaffold	
Particle size	ca. 40 – 130 μm	
Ion exchange capacity	0.09～0.21m eq /ml	0.10～0.22m eq /ml
Flow velocity	600 cm/h (0.3Mpa) I.D. 30 cm-L 20 cm, pure water at 24ºC	
Dynamic binding capacity	>130mg IgG/ml gel	>180mg IgG/ml gel
pH stability (40ºC, 1week)	2 - 14	3 - 14
Chemical stability	Stable all commonly used aqueous buffers, 1M NaOH	
Storage	20% ethanol	

可動アダプターを持つカラムへの充填

1. 充填に必要なゲル容量の算出（自然沈降体積）
   (a) 充填ベッド体積(ml)=カラム断面積(cm^2) x ベッド高さ(cm)
   (b) 充填必要ゲル体積（自然沈降体積）=充填ベッド体積 x1.1
   (c) 自然沈降体積は、スラリーをメスシリンダーに入れて一夜放置し、沈降したゲルの体積から調べる。
2. ゲルを純水、あるいは平衡化バッファーで洗浄する。
3. 洗浄液で 40□60%(V/V)スラリーを調整する。充填する環境の温度に平衡化する（約１時間放置）
4. 攪拌してスラリー中の気泡を除く。可能であれば、減圧環境に１５分程度放置するとより脱気できる。
5. カラム
   (a) 使用するカラムの取扱説明書に従って、事前にカラムの組み立てをする。
   (b) カラムのフィルターは水や 20%エタノールなどに浸して気泡を除去しておく。
   (c) カラムチューブに充填液（スラリー調整液）を流し入れて液漏れしないか確認した後、カラム出口の栓を外し液を抜き出す。カラムチューブの下 0.5～１ｃｍの高さに充填液がなったら栓を閉める。
6. 気泡が入らないようにスラリーをカラムに注ぎ入れる。カラムチューブ体積よりもスラリーが多い場合はリザーバーが必要な場合もある。

7. スラリーを注ぎ終えたら、上部のコネクターを接続する。この際に気泡が入らないように注意する。上部コネクターのフィルター、接続チューブの気泡はあらかじめ除いておく。
8. カラム出口の栓を開けて充填液を 1,000cm/h か、カラム入り口の圧力が 0.3Mpa で 10 分間流し続ける。（注意：カラム耐圧以上の圧力では充填しない事）
9. 圧縮されたゲルベッドの高さに目印をしておき、ポンプを停止しカラム出口の栓を閉める。
10. 上部アダプターのチューブラインを緩めるか外して、その後アダプターのシールを緩めてから、アダプターを目印のラインまで下げる。
11. アダプターをセットしてベッドが安定したら、アダプターをその位置で固定しチューブラインを再び接続し平衡化バッファーをカラム体積の 10 倍程度流す。

固定長のカラムへの充填

1. 充填に必要なゲル容量の算出（自然沈降体積）
   (a) 充填ベッド体積(ml)=カラム断面積(cm^2) x ベッド高さ(cm)
   (b) 充填必要ゲル体積（自然沈降体積）=充填ベッド体積 x1.2
      ① 注意:通常、固定長カラムに充填する場合は、リザーバーが必要である。そのために、固定長カラムの体積より過剰の自然沈降体積のゲルスラリーを準備する。その量はリザーバーの容積に依存するが１.１倍以上になる。
   (c) 自然沈降体積は、スラリーをメスシリンダーに入れて一夜放置し、沈降したゲルの体積から調べる。
2. ゲルを純水、あるいは平衡化バッファーで洗浄する。
3. 洗浄液で 40□60%(V/V)スラリーを調整する。充填する環境の温度に平衡化する（約１時間放置）.
4. 攪拌してスラリー中の気泡を除く。可能であれば、減圧環境に１５分程度放置するとより脱気できる。
5. カラム
   (a) 使用するカラムの取扱説明書に従って、事前にカラムの組み立てをする。
   (b) カラムのフィルターは水や 20%エタノールなどに浸して気泡を除去しておく。
   (c) カラムチューブに充填液（スラリー調整液）を流し入れて液漏れしないか確認した後、カラム出口の栓を外し液を抜き出す。カラムチューブの下 0.5～１ｃｍの高さに充填液がなったら栓を閉める。
6. 気泡が入らないようにスラリーをカラムに注ぎ入れる。
7. リザーバー（パッキングコネクター）にチューブラインを接続する。
8. カラム出口の栓を開けて充填液を 1,000cm/h か、カラム入り口の圧力が 0.3Mpa で 10 分間流し続ける。（注意：カラム耐圧以上の圧力では充填しない事）
9. ポンプを停止し、カラム出口の栓を閉める。
10. リザーバー（パッキングコネクター）のチューブラインを取り外す。その後、リザーバーを取り外して、過剰のゲルを取り除く。
11. .カラム上部のアダプターをセットし、チューブラインを接続して平衡化バッファーをカラム体積の 10 倍程度流す。

カラム充填の評価

appendix 1　を参照下さい

操作のガイドライン

一般的な操作方法

通常のイオン交換体と同様に、セルファイン MAX 強カチオン交換体も比較的低いイオン強度（0.1M NaCl 以下）でタンパク質の等電点よりも低い pH(４－９)で吸着させます。吸着容量は pH と電気伝導度（イオン濃度）に強く影響を受けます。下の表は、吸着容量に対する pH、NaCl 濃度の影響を示しています。目的タンパク質に適したスクリーニング試験を予備的に実施することを推奨します。

吸着条件でカラムに吸着されたタンパク質（正のチャージ）は、塩濃度を段階的に増加するステップワイズ法、あるいは塩の直線的な濃度勾配（グラジエント法）に よってカラムから溶出されます。

Table. 10%DBC vs. pH and NaCl concentration

Cellufine MAX S-r 10%DBC of polyclonal		pH 4.3	pH 5.0	pH 5.5
NaCl mM (in 10mM acetate buffer)	10	133	192	158
	50	159	107	3
	100	121	1	–

Cellufine MAX S-h 10%DBC of polyclonal IgG(mg/mL)		pH 4.3	pH 5.0	pH 5.5
NaCl mM (in 10mM acetate buffer)	10	207	228	238
	50	188	199	2
	100	150	1	–

Cellufine MAX S-r 10%DBC of Lysozyme(mg/mL)		pH 7.8	pH 8.5	pH 9.5
NaCl mM (in 50mM Tris-HCl buffer)	10	124	143	160
	50	93	119	134
	100	59	69	–

Cellufine MAX S-h 10%DBC of Lysozyme(mg/mL)		pH 7.8	pH 8.5	pH 9.5
NaCl mM (in 50mM Tris-HCl buffer)	10	156	167	198
	50	104	134	156
	100	63	74	–

サンプルの調整とカラムへの添加

遠心分離や精密ろ過によって不溶性物質を除去してサンプルを清澄化します。 一般的にサンプルは吸着バッファー中に１－２０mg/ｍｌ程度の濃度に調整します。必要であれば、吸着バッファーに対して透析するか、セルファイン GH-25 ゲルろ過クロマトグラフィーでバッファー交換し、pH、イオン濃度を調整します。

推奨するバッファー

吸着バッファー: 0.01 – 0.05 M 酢酸バッファー (pH 4 to 6)
溶出バッファー: 0.1 – 2.0 M NaCl を含む吸着バッファー.
その他、一般的なバッファーも使用可能である。

再生と平衡化

分離操作終了後、高塩濃度 1-2M NaCl を含む溶液をカラム体積５倍程度流し、ゲルにイオン交換的に吸着した物質を洗い流す。その後、平衡化バッファー（吸着バッファー）をカラム体積の５倍、あるいはカラム溶出液が平衡化バッファーと同程度の pH、イオン強度になるまで流し平衡化する。

パイロジェンフリー操作

カラムをカラム体積の５倍程度の 0.2M NaOH で洗浄しその後、１６時間程度アルカリと接触させる、その後パイロジェンフリー水あるいは平衡化バッファーを流しアルカリを洗い流す。
•NaOH-20%エタノールはよりエンドトキシン除去の有効である。さらに、0.2M NaOH-90%エタノールは２時間程度の接触でエンドトキシン除去の効果がある。

安定性

一般的な塩類に安定(NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, etc.)
pH 2 to pH14 (MAX S-r) , pH3 to pH14 (MAX S-h) at 40ºC,1week

定置洗浄　Cleaning-in-place (CIP)
セルファイン MAX S シリーズは 0.5M NaOH で 300 回程度洗浄しても、性能劣化はほとんど見られない。

流速
セルファイン MAX S シリーズは高度に架橋したベースを使用しており、高流速での操作が可能である。
1,000cm/h in a 2.2cm diameter column with 20cm bed height at <0.3Mpa.
Over 500cm/h 30cm diameter column with 20cm bed height at <0.3Mpa.

保存
未開封のボトル入り製品は室温で保存可能。
pH 2－14 (MAX S-r)、pH 3－14 (MAX S-h)で２週間程度の保存は室温で可能。長期保存は 20%エタノール中 2ºC－8ºC で保存する。凍結はさせないで下さい。

参考文献
1. Harris, E.L.V. and Angal, S., *Protein Purification Methods: A practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1989.
2. Janson, J.-C. and Ryden, L., *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications.* 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998

セルファイン MAX　製品番号 (Catalogue No.)

Media type	Pack Size					
	MC* 1ml x 5	MC 5ml x 5	100ml	500ml	5L	10L
Cellufine MAX S-r	20300-51	20300-55	20300	20301	20302	20303
Cellufine MAX S-h	20400-51	20400-55	20400	20401	20402	20403

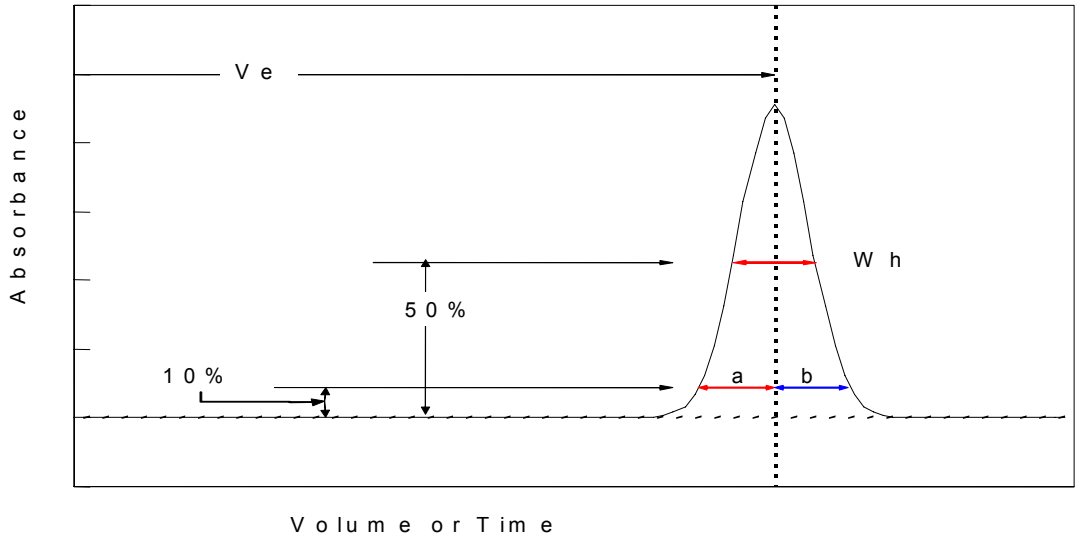
MC = Mini-Column

JNC株式会社
〒100-8105 東京都大手町二丁目２番１号
ライフケミカル推進室
電話 03-3243-6150 FAX 03-3243-6219
URL:http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine
e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

Appendix: セルファインカラム充填評価

カラムの充填状況の評価方法として、**理論段数(N)**、**理論段数高さ(HETP)**、**対称性ファクター(As)**などの指標がある。
段数の測定は、測定コンディションに非常に依存する傾向がある。例えば、カラムの径/高さの違い、配管の違い、溶質・溶媒サンプル体積、流速、温度などにより変化する。従って、測定するコンディションは毎回同じにする必要がある。

Conditions	
サンプル体積	ベッド体積の 1%　（最大 2.5%）
サンプル濃度	1-2%(V/V)アセトン　or　1M NaCl
流速	～30cm/h　(1 時間当たりの流量(ml)をカラム断面積(ｃｍ$^{2)}$で割った数値)
検出器	UV 検出器、電気伝導度計



計算式
HETP＝L／N
N＝5.54×(Ve／Wh)²
As＝b／a

L	カラムベッド高さ （cm　or m)
Ve	ピーク溶出体積　または　時間
Wh	ピーク半値幅　（ピーク高さの半分時のピーク幅）　体積または時間
a,b	ピーク高さ 10%の高さのピーク幅、a は前半、bは後半。
注意	Ve, Whと a,b は同じ単位で計算する。

（参考）
N は大きい方が、HETP は小さい方が良い。As は1に近い方が良い。
対称性ファクタ As は　0.8～1.6 の範囲であれば通常であると言われている。